

10/509622

Rec'd PCT/PTO 29 SEP 2002

PCT/JP 03/07148

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

05.06.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2002年 6月 6日
Date of Application:

出願番号 特願2002-165612
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2002-165612]

出願人 山之内製薬株式会社
Applicant(s):

REC'D 25 JUL 2003

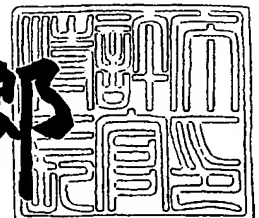
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



【書類名】 特許願

【整理番号】 0000003150

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 14/00

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内

 【氏名】 川上 政勝

【特許出願人】

 【識別番号】 000006677

 【氏名又は名称】 山之内製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100089200

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 長井 省三

【選任した代理人】

 【識別番号】 100109357

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 矢野 恵美子

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 005348

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規オキシダーゼ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (1) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、関節リウマチ患者特異的に発現するポリペプチド、あるいは、(2) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列において、1 または数個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、関節リウマチ患者特異的に発現するポリペプチド。

【請求項 2】 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項 3】 請求項 1 または、請求項 2 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 4】 請求項 3 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 5】 請求項 4 に記載の発現ベクターで形質転換された細胞。

【請求項 6】 (1) 被験者における、請求項 3 に記載の塩基配列を含む遺伝子の発現レベルを測定する工程、及び (2) 健常者における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程を含むことを特徴とする、関節リウマチの検査方法。

【請求項 7】 請求項 3 で表されるオキシダーゼ遺伝子を特異的に増幅できるように設計した順方向及び逆方向プライマーを含む関節リウマチ検査用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なオキシダーゼであるポリペプチド、該ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、該ベクターを含有する形質転換細胞及び関節リウマチ (RA と略す) 診断に有用な検査方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

ニコチンアミド-アデニンジヌクレオチドリソ酸 (NADPH) オキシダーゼはNADPHから電子を受け取り、それを最終的に酸素分子に渡して活性酸素種 (ROSと略す) を生成する酵素である。生理的には主に食細胞に存在する前記酵素は微生物等の異物の侵入に対し、ROSを生成し殺菌するような生体防御に重要な働きをしている。しかし、この酵素によるROSの過剰な生成はタンパク質、DNAの切断や過酸化脂質による膜の損傷などを引き起こし、細胞および組織の障害、ひいては炎症性疾患、血管病、神経変性疾患、癌、心疾患などをはじめとする様々な疾患の原因となることが知られている (Grisham, MB. et al., Trends. Pharmacol. Sci., 21, 119-120, 2000) (Halliwell, B. et al., FEBS Lett, 281, 9-19, 1991)。しかしながら、ROSを生成するNADPHオキシダーゼはその発現が全身性に分布するため、創薬の標的としては副作用が懸念されていた。

一方、最近の研究により非食細胞に存在するNADPHオキシダーゼファミリー、NOX1が同定され、食細胞以外にもROSが組織特異的に生成されていることが報告された (Suh, Y. et al., Nature, 401, 79-82, 1999)。NOX1は大腸に多量に存在し、細胞増殖や様々な遺伝子発現誘導を引き起こすことが報告され、大腸における様々な疾患に関わることが示唆されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は疾患の原因となるROSを生成する酵素であり、その疾患の診断に有用な新規なオキシダーゼを提供することを課題とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ヒトRA患者由来滑膜細胞から新規なオキシダーゼ遺伝子全長配列を決定することに成功した (NOX1-bと称する)。さらに、該オキシダーゼ遺伝子は、健常人由来滑膜細胞には発現しておらず、RA患者由来滑膜細胞に特異的に発現していることを見出し、該オキシダーゼ特異的なポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) プライマーを用いることによりRA診断法として有用な検査方法を可能にした。

【0005】

すなわち本発明は、

[1] (1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、関節リウマチ患者特異的に発現するポリペプチド、あるいは、(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、関節リウマチ患者特異的に発現するポリペプチド、

[2] 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

[3] 請求項1または、請求項2に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、

[4] 請求項3に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター、

[5] 請求項4に記載の発現ベクターで形質転換された細胞、

[6] (1) 被験者における、請求項3に記載の塩基配列を含む遺伝子の発現レベルを測定する工程、(2) 健常者における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程

を含むことを特徴とする、関節リウマチの検査方法、

[7] 請求項3で表されるオキシダーゼ遺伝子を特異的に増幅できるように設計した順方向及び逆方向プライマーを含む関節リウマチ検査用キットに関する。

【0006】

【発明の実施の形態】

本明細書において、「RA」は「関節リウマチ」の略語として用いる。従来RAの日本語訳は「慢性関節リウマチ」であったが、2002年の日本リウマチ学会においてRAの日本語訳を「慢性関節リウマチ」から「関節リウマチ」と変更するとの発表がなされているので、本明細書ではそれに従った。

本発明のポリペプチドには、

(1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド；

(1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1または数個のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含

み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド；（以下、機能的等価改変体と称する）；及び

（3）配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を有し、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド（以下、相同ポリペプチドと称する）；

が含まれる。

【0007】

「本発明の機能的等価改変体」としては、「配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド」、あるいは、「配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1または数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～7個、更に好ましくは1～5個）のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド」が好ましい。

「本発明の相同ポリペプチド」は、「配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上であるアミノ酸配列を有し、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド」である限り、特に限定されるものではないが、該相同性が、好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上であるアミノ酸配列を含むポリペプチドが好ましい。

なお、本明細書における前記「相同性」とは、BLAST (Basic local alignment search tool; Altschul, S. F. ら, J. Mol. Biol., 215, 403-410, 1990) 検索により得られた値を意味する。

本発明の機能的等価改変体および相同ポリペプチドの起源はヒトに限定されない。例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列のヒトにおける変異体が含まれるだけでなく、ヒト以外の生物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、又はイヌ）由来の機能的等価改変体または相同ポリペプチドが含まれる。更には、それらの天然ポリペプチド（すなわち、ヒト由来の変異体、又はヒト以外の生物由来の機能的等価改変体または相同ポリペプチド）又は、配列番号2で表されるアミノ酸配列を元にして遺伝子工学的に人為的に改変したポリペプチドなどが含まれ

る。なお、本明細書において「変異体」(variation)とは、同一種内の同一ポリペプチドにみられる個体差、あるいは、数種間の相同ポリペプチドにみられる差異を意味する。

【0008】

以上、本発明のポリペプチドについて説明したが、配列番号2で表されるアミノ酸からなるポリペプチド、本発明の機能的等価改変体、及び本発明の相同ポリペプチドを総称して、以下、「本発明のポリペプチド」と称する。「本発明のポリペプチド」のうち、配列番号2で表されるアミノ酸からなるポリペプチドである蛋白質を「NOX1-b蛋白質」と称する。

本発明のポリペプチドとしては、「配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」、「配列番号2で表されるアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド、あるいは、配列番号2で表されるアミノ酸配列において、1または数個（好ましくは1～10個、より好ましくは1～7個、更に好ましくは1～5個）のアミノ酸が置換、欠失、及び／又は挿入されたアミノ酸配列を含み、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド」あるいは、「配列番号2で表されるアミノ酸配列との相同性が90%以上（好ましくは95%以上、更に好ましくは98%以上）であるアミノ酸配列を有し、しかも、RA患者特異的に発現するポリペプチド」が好ましく、「配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド」がより好ましい。

【0009】

また、本発明のNOX1-b蛋白質をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチドは、配列番号2記載のアミノ酸配列で示されるNOX1-b蛋白質、その機能的等価改変体、あるいは、その相同ポリペプチドをコードする塩基配列なら何れでもよい。好ましくは、配列番号2記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドであり、さらに好ましくは、配列番号1記載の塩基配列である。

【0010】

本発明のポリヌクレオチドの製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、(1) PCRを用いた方法、(2) 常法の遺伝子工学的手法（すなわち cDNA

ライブラリーで形質転換した形質転換株から所望のアミノ酸を含む形質転換株を選択する方法)を用いる方法、又は(3)化学合成法などを挙げることができる。各製造方法については、新規酵素の発明を開示したW001/34785の記載と同様に実施できる。ただし、上記特許出願明細書における「本発明の新規蛋白」を本発明の蛋白質(NOX-1b蛋白質)、「本発明の遺伝子」を本発明の遺伝子(NOX1-b)と読み替える。詳細には、

PCRを用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1)蛋白質遺伝子の製造方法a)第1製造法に記載された手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。本発明の蛋白質を産生する能力を有する細胞あるいは組織、例えば、ヒトRA患者由来滑膜からmRNAを抽出する。次いで、このmRNAをランダムプライマーまたはオリゴdTプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い、第一鎖cDNAを合成することが出来る。得られた第一鎖cDNAを用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ2種類のプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に供し、本発明のポリヌクレオチドまたはその一部を得ることができる。より具体的には、例えば配列番号5及び配列番号6で表される配列をプライマーとして、実施例1に記載の方法により本発明のポリヌクレオチドを製造することが出来る。

常法の遺伝子工学的手法を用いる方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1)蛋白質遺伝子の製造方法b)第2製造法に記載された手順により、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

化学合成法を用いた方法では、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」1)蛋白質遺伝子の製造方法c)第3製造法、d)第4製造法に記載された方法によって、本発明のポリヌクレオチドを製造することができる。

本発明の発現ベクター、宿主細胞、蛋白質の製造方法は、例えば、前記特許文献の「発明の実施の形態」2)本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明の組換え蛋白の製造方法に記載された方法により実施できる。より具体的には、本発明の発現ベクターはほ乳類動物細胞の発現ベクターpcDNA3.1/HisBを用い実施例2に記載の方法で、本発明の宿主細胞及び蛋白質はNIH3T3細胞をトランスフェクション試薬で形質転換する実施例3に記載の方法で製造できる。

本発明のポリヌクレオチドは、それ自体後述のRAの検査方法においてハイブリダイズプローブとして用いることができ、RAの検査に有用である。また、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドを特異的に認識する抗体の作製や、発現レベルを検出・定量する際のコントロールとして用いることができる。

【0011】

<RAの検査方法／RA検査用キット>

後述のように、健常者由来のサンプルにはNOX 1-bが発現しておらず、RA患者由来のサンプルに特異的にNOX 1-bが発現していることを見出したことから、この発現を利用してRA疾患を検出することが出来る。具体的には、次の工程を含む態様が例示される。すなわち、

(1) 被験者における、請求項3に記載の塩基配列を含む遺伝子の発現レベルを測定する工程、及び(2) 健常者における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程、である。

本発明のRAの検査方法における遺伝子の発現レベルとは、該遺伝子のmRNAへの転写、並びに蛋白質への翻訳を含む。従って、本発明によるRAの検査方法は、NOX 1-b遺伝子に対応するmRNAの発現レベル、または、該遺伝子によってコードされる蛋白質の発現レベルの比較に基づいて行われる。

工程(1)における請求項3に記載の塩基配列を含む遺伝子(NOX 1-b遺伝子)の発現レベルを測定する方法は公知の遺伝子解析法に従って実施することが出来る。例えば、NOX 1-b遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション技術、または、NOX 1-b遺伝子にハイブリダイズするDNAをプライマーとした遺伝子増幅技術等を利用することが出来る。具体的には、被験者から得た滑膜細胞由来の核酸、例えばmRNA等を用いて測定することが出来る。mRNA量の測定は、NOX 1-b配列を特異的に増幅できるように設計したプライマーを用いて遺伝子増幅反応方法にて測定できる。遺伝子増幅反応方法としては、特に限定されないが、PCR法、RNAポリメラーゼを利用した核酸増幅法などを利用することが出来る。より具体的には、実施例4に記載の方法により実施できる。本発明のRAの検査方法に用いられるプライマー、または、RA検査用キットに含まれるプライマーは、NOX 1-b配列を特異的に増幅できるものであれば、特には限定され

ず、NOX1-b塩基配列に基づいて設計できる。好ましくは、配列番号5及び配列番号6に記載されたオリゴヌクレオチドである。

ハイブリダイゼーション技術を利用したRAの検査は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、ドットプロット法、DNAマイクロアレイ法などを使用して行うことが出来る。さらには、RT-PCR等の遺伝子増幅技術を利用することでできる。RT-PCR法においては、遺伝子の増幅過程においてPCR増幅モニター（リアルタイムPCR）法を用いることにより、NOX1-b遺伝子の発現について、より定量的な解析を行うことが可能である。PCR増幅モニター法としては、例えば、ABI PRISM7700（アプライドバイオシステムズ社）を用いることが出来る。

また、工程（1）において、請求項3に記載の塩基配列を含む遺伝子の発現レベルを測定する方法として、発現レベルを本発明のポリペプチドからなる蛋白質、好ましくは、NOX1-b蛋白質の検出によって測定する方法が可能である。このような検査方法としては、例えば、被験者から得た滑膜細胞由来の細胞抽出液を用いて、本発明のポリペプチドからなる蛋白質、好ましくはNOX1-b蛋白質に結合する抗体、より好ましくはNOX1-bに特異的に結合する抗体を利用したウエスタンブロッティング、免疫沈降法、ELISA法などを利用することが出来る。

工程（2）においては、工程（1）で得られた発現レベルと健常者における発現レベルと比較するのであれば、比較方法は特に限定されず、例えば実施例4に記載の方法で比較できる。

本発明のRA検査用キットには、少なくとも、本発明のポリペプチドを特異的に増幅できるように設計した順方向及び逆方向プライマーが含まれる。順方向及び逆方向プライマー対の例としては、配列番号5及び配列番号6に記載の塩基配列で表されるプライマーが挙げられる。本発明のRA検査用キットに含めることが出来る他の試薬としては、PCRを行うのに必要な試薬（例えば、Taqポリメラーゼ、ヌクレオチド基質、緩衝液など）などを挙げることができる。

【0012】

【実施例】

以下に実施例により本発明を詳述するが、本発明は該実施例によって限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法（Sambrook,

J. et al., "Molecular Cloning-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1989) 等の遺伝子操作実験マニュアルや試薬等に添付のマニュアルに従った。

【0013】

(実施例1) 新規オキシダーゼNOX1-bの取得と全長オープンリーディングフレーム (open reading frame、ORF) 配列の決定

キアゲン社のRNA抽出キット (RNAeasy Protect Mini Kit) を用いて東洋紡績社のRA患者由来滑膜細胞 (HS-RA) よりmRNAを精製し、スーパースクリプト

II (SUPERSCRIPT First-Strand Synthesis System for RT-PCR) (Gibco-BRL社製) を用い cDNA に転換することにより作製した自家製の cDNA を鋳型とした。配列番号3と配列番号4で表されるNOX1のORFの外側をコードするオリゴDNAを合成し、DNAポリメラーゼ (PLATINUM™ Taq DNA polymerase; インビトロジェン社) を用いて、94℃1分の後、94℃30秒、55℃30秒、68℃3分のサイクルを35回のPCR反応を行った。この反応により得られたcDNAをクローニングベクター (TAクローニングキット; インビトロジェン社) に挿入 (NOX1ベクター) し、ジデオキシターミネーター法によりABI3700 DNA シークエンサー (アプライドバイオシステムズ社) で解析し、ORF配列を決定した。この遺伝子をNOX1-bと名付けた。該遺伝子の全長塩基配列を配列番号1に、推定アミノ酸配列を配列番号2に示した。NOX1-bのORF配列はNOX1 (Genbankアクセッション番号: AF127763) の第433番目から第481番目までがスプライシングアウトされた新規蛋白質をコードしていた。

【0014】

(実施例2) NOX1-b全長ORFのクローニングと蛋白質発現プラスミドの構築
実施例1で作製したNOX1-bベクターをEcoRI、XhoIで切断し、蛋白質発現ベクター (pcDNA3.1/HisB; インビトロジェン社) のEcoRI、XhoI部位に挿入して、全長蛋白質発現プラスミドpcDNA3.1/HisB・NOX1-bを完成した。

【0015】

(実施例 3) HisB・NOX1-bの動物細胞株での発現

10cmプレートにNIH3T3細胞（大日本製薬社製）を 1×10^6 細胞でプレーティングして12時間培養後、実施例 2 において作製した発現プラスミドpcDNA3.1/HisB・NOX1-b及び空ベクターpcDNA3.1/HisBを、トランスフェクション試薬（FuGENETM 6 Transfection Reagent；ロシュ社製）を用いて添付指示書に従い、NIH3T3細胞に導入した。プラスミド導入後12-16時間で培地を無血清に置換した後、さらに48-60時間培養を継続した。導入細胞をPBSで洗浄後、SDSサンプルバッファー（S.B）で回収した。S.B中に目的蛋白質が存在することをNOX1蛋白質とNOX1-b蛋白質共通のC末端配列をエピトープとして認識する抗体（ウサギ抗MOX抗体；サンタクルズ社製）を用いたウエスタンブロッティングで確認した。すなわち、回収した上記S.BをSDS/4%~20% アクリルアミドゲル（第一化学薬品社製）に電気泳動（還元条件）後、ブロッティング装置を用いてPVDF膜（ミリポア社製）に転写した。転写後のPVDF膜にブロックエース（大日本製薬社製）を添加してブロッキングした後、ビオチン化ウサギ抗IgG抗体（M2；シグマ社製）、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（アマシャムファルマシア社製）を順次反応させた。反応後、ECLウエスタンブロッティング検出システム（アマシャムファルマシア社製）を用いて目的蛋白質の発現を確認した。pcDNA3.1/HisB・NOX1-b導入細胞より得たサンプルには、分子量 52 ± 0.5 kDのバンドが検出されたが、空ベクター導入細胞より得たサンプルにはバンドは検出されず、pcDNA3.1/HisB・NOX1-b導入細胞でHisB・NOX1-bが発現していることがわかった。

【0016】

(実施例 4) RA患者由来滑膜細胞におけるNOX1-b mRNAの発現上昇

実施例 1 で示したmRNA抽出法を用いて、大日本製薬社の健常人由来滑膜細胞（Cell System-SS cells）から自家製のcDNAを作製した。配列番号 5 と配列番号 6 で表されるNOX1-b特異的な配列をコードするプローブプライマーを合成し、RA、健常人由来の各サンプル（各鋳型cDNAを1、1/10、1/100の希釈倍率で希釈したもの）に対してDNAポリメラーゼ（rTaq DNA polymerase；東洋紡績社）を用いて、94℃1分の後、94℃10秒、55℃20秒、72℃30秒のサイク

ルを45回の半定量的RT-PCR反応を行った。配列番号5で表されるプライマー配列は、NOX1がスプライシングアウトされた接続部位、すなわちNOX1蛋白質の第432番目と第482番目を接続した部位をコードするヌクレオチド配列であり、よってNOX1を認識しない配列である。従って、配列番号5と配列番号6によるPCR産物はNOX1-b特異的なものである。PCR反応物をアガロースゲルに電気泳動し、エチジウムブロマイド (EtBr) 染色によりDNAを検出したところ、NOX1-bと予想されるサイズのバンドがRA由来のサンプルでは認められたが、健常人のサンプルでは認めることができなかった。一方、コントロールである、配列番号7と配列番号8で表されるプライマーを用いたグリセルアルデヒド三リン酸脱水素酵素 (G3PDH) のPCR反応においては、RA、健常人サンプル共に同様なEtBr染色によるバンドが認められた (図1)。これらのことより、健常人に対し、RA患者由来滑膜細胞において、NOX1-b発現量が有意に亢進していることが明らかとなった。また、本実施例記載の方法でRA診断の検査が可能であることがわかった。

【0017】

【発明の効果】

本発明のポリヌクレオチドは、その発現亢進が病態と結びついていることから、RA診断の指標となることが解かった。本発明のポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドによってコードされる本発明のポリペプチドの発現を指標にすることによりRA診断の検査を行うことが可能となった。また、本発明は、RA患者由来滑膜細胞に特異的に発現する新規オキシダーゼを提供するものであり、その特異的なプライマー配列を用いたPCRによりRA診断の検査へ応用できることが期待される。

【0018】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<120> Novel oxidase

<130> 3150NXI

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1548

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1548)

<400> 1

atg gga aac tgg gtg gtt aac cac tgg ttt tca gtt ttg ttt ctg gtt 48

Met Gly Asn Trp Val Val Asn His Trp Phe Ser Val Leu Phe Leu Val

1

5

10

15

gtt tgg tta ggg ctg aat gtt ttc ctg ttt gtg gat gcc ttc ctg aaa 96

Val Trp Leu Gly Leu Asn Val Phe Leu Phe Val Asp Ala Phe Leu Lys

20

25

30

tat gag aag gcc gac aaa tac tac tac aca aga aaa atc ctt ggg tca 144
Tyr Glu Lys Ala Asp Lys Tyr Tyr Tyr Thr Arg Lys Ile Leu Gly Ser

35

40

45

aca ttg gcc tgt gcc cga gcg tct gct ctc tgc ttg aat ttt aac agc 192
Thr Leu Ala Cys Ala Arg Ala Ser Ala Leu Cys Leu Asn Phe Asn Ser

50

55

60

acg ctg atc ctg ctt cct gtg tgt cgc aat ctg ctg tcc ttc ctg agg 240
Thr Leu Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Leu Leu Ser Phe Leu Arg

65

70

75

80

ggc acc tgc tca ttt tgc agc cgc aca ctg aga aag caa ttg gat cac 288
Gly Thr Cys Ser Phe Cys Ser Arg Thr Leu Arg Lys Gln Leu Asp His

85

90

95

aac ctc acc ttc cac aag ctg gtg gcc tat atg atc tgc cta cat aca 336
Asn Leu Thr Phe His Lys Leu Val Ala Tyr Met Ile Cys Leu His Thr

100

105

110

gct att cac atc att gca cac ctg ttt aac ttt gac tgc tat agc aga 384
Ala Ile His Ile Ile Ala His Leu Phe Asn Phe Asp Cys Tyr Ser Arg

115

120

125

agc cga cag gcc aca gat ggc tcc ctt gcc tcc att ctc tcc agc cta 432
Ser Arg Gln Ala Thr Asp Gly Ser Leu Ala Ser Ile Leu Ser Ser Leu

130

135

140

tct cat gat gag aaa aag ggg ggt tct tgg cta aat ccc atc cag tcc 480
Ser His Asp Glu Lys Lys Gly Gly Ser Trp Leu Asn Pro Ile Gln Ser
145 150 155 160

cga aac acg aca gtg gag tat gtg aca ttc acc agc gtt gct ggt ctc 528
Arg Asn Thr Thr Val Glu Tyr Val Thr Phe Thr Ser Val Ala Gly Leu
165 170 175

act gga gtg atc atg aca ata gcc ttg att ctc atg gta act tca gct 576
Thr Gly Val Ile Met Thr Ile Ala Leu Ile Leu Met Val Thr Ser Ala
180 185 190

act gag ttc atc cgg agg agt tat ttt gaa gtc ttc tgg tat act cac 624
Thr Glu Phe Ile Arg Arg Ser Tyr Phe Glu Val Phe Trp Tyr Thr His
195 200 205

cac ctt ttt atc ttc tat atc ctt ggc tta ggg att cac ggc att ggt 672
His Leu Phe Ile Phe Tyr Ile Leu Gly Leu Gly Ile His Gly Ile Gly
210 215 220

gga att gtc cgg ggt caa aca gag gag agc atg aat gag agt cat cct 720
Gly Ile Val Arg Gly Gln Thr Glu Glu Ser Met Asn Glu Ser His Pro
225 230 235 240

cgc aag tgt gca gag tct ttt gag atg tgg gat gat cgt gac tcc cac 768
Arg Lys Cys Ala Glu Ser Phe Glu Met Trp Asp Asp Arg Asp Ser His
245 250 255

tgt agg cgc cct aag ttt gaa ggg cat ccc cct gag tct tgg aag tgg 816

Cys Arg Arg Pro Lys Phe Glu Gly His Pro Pro Glu Ser Trp Lys Trp
260 265 270

atc ctt gca ccg gtc att ctt tat atc tgt gaa agg atc ctc cgg ttt 864
Ile Leu Ala Pro Val Ile Leu Tyr Ile Cys Glu Arg Ile Leu Arg Phe
275 280 285

tac cgc tcc cag cag aag gtt gtg att acc aag gtt gtt atg cac cca 912
Tyr Arg Ser Gln Gln Lys Val Val Ile Thr Lys Val Val Met His Pro
290 295 300

tcc aaa gtt ttg gaa ttg cag atg aac aag cgt ggc ttc agc atg gaa 960
Ser Lys Val Leu Glu Leu Gln Met Asn Lys Arg Gly Phe Ser Met Glu
305 310 315 320

gtg ggg cag tat atc ttt gtt aat tgc ccc tca atc tct ctc ctg gaa 1008
Val Gly Gln Tyr Ile Phe Val Asn Cys Pro Ser Ile Ser Leu Leu Glu
325 330 335

tgg cat cct ttt act ttg acc tct gct cca gag gaa gat ttc ttc tcc 1056
Trp His Pro Phe Thr Leu Thr Ser Ala Pro Glu Glu Asp Phe Phe Ser
340 345 350

att cat atc cga gca gca ggg gac tgg aca gaa aat ctc ata agg gct 1104
Ile His Ile Arg Ala Ala Gly Asp Trp Thr Glu Asn Leu Ile Arg Ala
355 360 365

ttc gaa caa caa tat tca cca att ccc agg att gaa gtg gat ggt ccc 1152
Phe Glu Gln Gln Tyr Ser Pro Ile Pro Arg Ile Glu Val Asp Gly Pro

370

375

380

ttt ggc aca gcc agt gag gat gtt ttc cag tat gaa gtg gct gtg ctg 1200
Phe Gly Thr Ala Ser Glu Asp Val Phe Gln Tyr Glu Val Ala Val Leu
385 390 395 400

gtt gga gca gga att ggg gtc acc ccc ttt gct tct. atc ttg aaa tcc 1248
Val Gly Ala Gly Ile Gly Val Thr Pro Phe Ala Ser Ile Leu Lys Ser
405 410 415

atc tgg tac aaa ttc cag tgt gca gac cac aac ctc aaa aca aaa aag 1296
Ile Trp Tyr Lys Phe Gln Cys Ala Asp His Asn Leu Lys Thr Lys Lys
420 425 430

gtt ggt cat gca gca tta aac ttt gac aag gcc act gac atc gtg aca 1344
Val Gly His Ala Ala Leu Asn Phe Asp Lys Ala Thr Asp Ile Val Thr
435 440 445

ggt ctg aaa cag aaa acc tcc ttt ggg aga cca atg tgg gac aat gag 1392
Gly Leu Lys Gln Lys Thr Ser Phe Gly Arg Pro Met Trp Asp Asn Glu
450 455 460

ttt tct aca ata gct acc tcc cac ccc aag tct gta gtg gga gtt ttc 1440
Phe Ser Thr Ile Ala Thr Ser His Pro Lys Ser Val Val Gly Val Phe
465 470 475 480

tta tgt ggc cct cgg act ttg gca aag agc ctg cgc aaa tgc tgt cac 1488
Leu Cys Gly Pro Arg Thr Leu Ala Lys Ser Leu Arg Lys Cys Cys His
485 490 495

cga tat tcc agt ctg gat cct aga aag gtt caa ttc tac ttc aac aaa 1536

Arg Tyr Ser Ser Leu Asp Pro Arg Lys Val Gln Phe Tyr Phe Asn Lys

500

505

510

gaa aat ttt tga

1548

Glu Asn Phe

515

<210> 2

<211> 515

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Asn Trp Val Val Asn His Trp Phe Ser Val Leu Phe Leu Val

1

5

10

15

Val Trp Leu Gly Leu Asn Val Phe Leu Phe Val Asp Ala Phe Leu Lys

20

25

30

Tyr Glu Lys Ala Asp Lys Tyr Tyr Tyr Thr Arg Lys Ile Leu Gly Ser

35

40

45

Thr Leu Ala Cys Ala Arg Ala Ser Ala Leu Cys Leu Asn Phe Asn Ser

50

55

60

Thr Leu Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Leu Leu Ser Phe Leu Arg

65

70

75

80

Gly Thr Cys Ser Phe Cys Ser Arg Thr Leu Arg Lys Gln Leu Asp His

85

90

95

Asn Leu Thr Phe His Lys Leu Val Ala Tyr Met Ile Cys Leu His Thr

100	105	110	
Ala Ile His Ile Ile Ala His Leu Phe Asn Phe Asp Cys Tyr Ser Arg			
115	120	125	
Ser Arg Gln Ala Thr Asp Gly Ser Leu Ala Ser Ile Leu Ser Ser Leu			
130	135	140	
Ser His Asp Glu Lys Lys Gly Gly Ser Trp Leu Asn Pro Ile Gln Ser			
145	150	155	160
Arg Asn Thr Thr Val Glu Tyr Val Thr Phe Thr Ser Val Ala Gly Leu			
165	170	175	
Thr Gly Val Ile Met Thr Ile Ala Leu Ile Leu Met Val Thr Ser Ala			
180	185	190	
Thr Glu Phe Ile Arg Arg Ser Tyr Phe Glu Val Phe Trp Tyr Thr His			
195	200	205	
His Leu Phe Ile Phe Tyr Ile Leu Gly Leu Gly Ile His Gly Ile Gly			
210	215	220	
Gly Ile Val Arg Gly Gln Thr Glu Glu Ser Met Asn Glu Ser His Pro			
225	230	235	240
Arg Lys Cys Ala Glu Ser Phe Glu Met Trp Asp Asp Arg Asp Ser His			
245	250	255	
Cys Arg Arg Pro Lys Phe Glu Gly His Pro Pro Glu Ser Trp Lys Trp			
260	265	270	
Ile Leu Ala Pro Val Ile Leu Tyr Ile Cys Glu Arg Ile Leu Arg Phe			
275	280	285	
Tyr Arg Ser Gln Gln Lys Val Val Ile Thr Lys Val Val Met His Pro			
290	295	300	
Ser Lys Val Leu Glu Leu Gln Met Asn Lys Arg Gly Phe Ser Met Glu			
305	310	315	320
Val Gly Gln Tyr Ile Phe Val Asn Cys Pro Ser Ile Ser Leu Leu Glu			
325	330	335	

Trp His Pro Phe Thr Leu Thr Ser Ala Pro Glu Glu Asp Phe Phe Ser
340 345 350

Ile His Ile Arg Ala Ala Gly Asp Trp Thr Glu Asn Leu Ile Arg Ala
355 360 365

Phe Glu Gln Gln Tyr Ser Pro Ile Pro Arg Ile Glu Val Asp Gly Pro
370 375 380

Phe Gly Thr Ala Ser Glu Asp Val Phe Gln Tyr Glu Val Ala Val Leu
385 390 395 400

Val Gly Ala Gly Ile Gly Val Thr Pro Phe Ala Ser Ile Leu Lys Ser
405 410 415

Ile Trp Tyr Lys Phe Gln Cys Ala Asp His Asn Leu Lys Thr Lys Lys
420 425 430

Val Gly His Ala Ala Leu Asn Phe Asp Lys Ala Thr Asp Ile Val Thr
435 440 445

Gly Leu Lys Gln Lys Thr Ser Phe Gly Arg Pro Met Trp Asp Asn Glu
450 455 460

Phe Ser Thr Ile Ala Thr Ser His Pro Lys Ser Val Val Gly Val Phe
465 470 475 480

Leu Cys Gly Pro Arg Thr Leu Ala Lys Ser Leu Arg Lys Cys Cys His
485 490 495

Arg Tyr Ser Ser Leu Asp Pro Arg Lys Val Gln Phe Tyr Phe Asn Lys
500 505 510

Glu Asn Phe
515

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gaagggtcc aaaccacctc ttgacaat

28

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

aaaatgcaga ttaccgtcct taticcttaa

30

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

aaaacaaaaa aggttggtca tgcagca

27

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

tcaaaaattt tctttgttga a

21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

accacagtcc atgccatcac

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

tccaccaccc tgttgctgta

20

【0019】

【図面の簡単な説明】

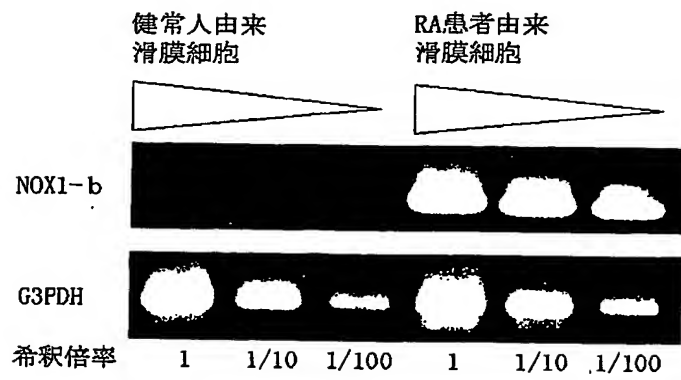
【図1】

RA患者由来滑膜細胞におけるNOX1-b mRNAの発現上昇を示す図である。

【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明はROSを生成する酵素である新規なオキシダーゼを提供することを課題とする。

【解決手段】 本発明者は、ヒトRA患者由来滑膜細胞から新規なオキシダーゼ遺伝子全長配列を決定することに成功した。さらに該オキシダーゼ遺伝子は、健康人由来滑膜細胞には発現しておらず、RA患者由来滑膜細胞に特異的に発現していることを見出し、該オキシダーゼ特異的なプライマーを設計することによりRA診断法として有用な検査方法を可能にした。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-165612
受付番号	50200823459
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 6月 7日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成14年 6月 6日

次頁無

特願2002-165612

出願人履歴情報

識別番号

[000006677]

1. 変更年月日

1990年 8月10日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

氏 名

山之内製薬株式会社